

# A DETOXIKÁLÓ, IMMUNOLÓGIAI ÉS NEM IMMUNOLÓGIAI TÉNYEZŐK SZEREPE A KÖRNYEZETI, FIZIKAI ÉS KÉMIAI FAKTOROK ÁLTAL ELŐIDÉZETT TÜDŐBETEGSÉGEK PATOMECHANIZMUSÁBAN

OTKA Nyilvántartási szám: T46733

Témavezető: Dr Tátrai, Erzsébet, Ph.D., D.Sc.

Időtartam: 2004. IV. 26 - 2007. IV. 13.

## 1.Egyszeri expozíciók

### **1.1 Azbesztpótló rostok , nikkeloxid, vasoxid nanopartikulumok és indoor egyszeri expozíciók (Stachybotris chartarum) in vivo és in vitro vizsgálata**

*In vivo vizsgálatok:* a bioszolubilis üvegrostokat intratracheálisan jutattuk be az állatok tüdejébe, ezt követően különböző időpontokban: az expozíciót követő 1,3, és 6 hónapban dolgoztuk fel a tüdőt . A szövettani és EDXA vizsgálatok kimutatták, hogy a **bioszolubilis üvegrostok** és komponenseik (salgótarjáni üvegrost) az első hónap végére eltűntek a tüdőkből, valószínűleg a szövetnedvekben oldódtak fel.

A **kőgyapot (stone-wool)** rostjai tartósan a tüdőben maradtak, perzisztáló gyulladást és mérsékelt fibrózist idézve elő. Komponenseiket EDXA vizsgálattal kimutattuk (1). Az *in vitro* vizsgálatok a tüdő első védelmi vonalának sejtjeiben (alveoláris makrofágok és II. típusú pneumocyták) a membránok folytonosságának megszakadását vagy multiplikációját okozták. A redox rendszer Cu,Zn/SOD és alkalikus foszfatáz (AP) aktivitását az alveoláris makrofágokban (AM) a rostok csökkentették; a GGT és AP aktivitását szignifikánsan csökkentették a II. pneumocytákban (P2) jelezve a **szabadgyök reakciók elleni védekezés csökkenését**. A makrofág tevékenységet befolyásoló **MCP-1 és MIP-1 $\alpha$  chemokinek expressziója – a sejtkárosodás jeleként – szignifikánsan emelkedett** (2,3,4,5).

A **refrakter kerámiarostok (tűzálló kerámiarost, RCF)** *In vivo:* idült interstitiális gyulladást okoztak a tüdőben, amely a 3. hónap után visszafejlődött, s a 6. hónapra az RCF-t alkotó elemek: Al, Si, EDXA-vizsgálattal már nem mutathatók ki. Ezzel párhuzamosan a **tüdő-elváltozás regrediált**. A redox rendszer elemei közül a tüdőben az EC-SOD aktivitása és a GSH tartalma nem változott. Az immunglobulinok közül a **sejtoros IgA csökkent** a BAL-ban. Az RCF egyidejűleg **csökkentette a lép lymphocytáinak proliferatív aktivitását, szignifikánsan csökkentette a T sejtek mitogénekre adott proliferatív**

aktivitását, továbbá a T-dependens B sejtek mitogénre (pokeweed) adott válaszát. (7). *In vitro*: a primer sejt kultúrákban (AM, P2) csak a nagy dózis (10 µg/ml) okozott membránkárosodást (8).

**1.2. Nikkeloxid respirábilis pora (< 10 µm) *in vivo*** az interstitiális gyulladáson kívül az alveoláris hámsejtek kiterjedt necrosisát és emphysemával társult fibrózist okozott az első hónap végére. A tüdő **GSH tartalma** az első hónap végére szignifikánsan **csökkent**, **EC-SOD aktivitása** szintén szignifikánsan **csökkent**. Az **IgA és IgM** termelődését a NiO **fokozta** a BAL-ban és vérben, az **IgG** a BAL-ban szignifikánsan **csökkent**. Az **MHC marker expressziója**, az **NK sejt aktivitás** az 1. hónap végére **csökkent**, a **lymphocyták bazális proliferatív aktivitása** a 6. hónap végére **csökkent** (9). *In vitro*: mindkét sejtben (AM, P2) már az 1 µg/ml koncentrációban a sejtmembránok feltöredezték, illetve folytonossághiányt mutattak lektinhisztokémiai módszerekkel (LC50). **Fokozódott az MCP-1 és MIP-1<sub>α</sub> expressziója** minden koncentrációban (1, 5, 10 µg/ml) az AM és P2 sejteknél.

**1.3. A vas(III)oxid nanopartikulumok** (29 nm átmérő, intratracheális kezelés, 1 mg/állat) az első hónap végére idült, gócos interstitiális gyulladást okoztak enyhe fibrózissal, s már az első napon az erek lumenében is megjelentek a nanopartikulumok (10, 11). **Az össz-glutation tartalom és EC-SOD aktivitás nem változott sem az első hét, sem a 4. hét végére.** *In vitro* vizsgálatok az alveoláris makrofágokból és II. típusú pneumocytákból: csupán a legnagyobb koncentrációban: 10 µg/ml lehetett a sejtek 50%-ban membránkárosodást megfigyelni lektinhisztokémiai módszerrel. A nano-vas hatására a **vérben csökkent az IgA-szint**, a BAL-ban azonban nem változott. Az **IgM és IgG szintek a BAL-ban csökkentek**. A sejtenyészetek felülúszójából vizsgált **MCP-1 és MIP-1<sub>α</sub> expressziója** megnövekedett mindkét sejtben, kivéve a II. pneumocyták **MIP-1<sub>α</sub> produkcióját**, amely csökkent.

**1.4. Indoor expozíció: Stachybotris chartarum** (fekete penész) endo- és exotoxinjának *in vitro* vizsgálata alveoláris makrofágok és II. típusú pneumocyták tenyésztésében (patkány, 12). A négy vizsgált törzsben gyakorlatilag azonos eredményeket kaptunk: a **II. pneumocytákban jelentősen csökkent** a membránhoz kötött **alkalikus foszfatáz aktivitás**, az **alveoláris makrofágokban** pedig a lysosomális marker enzim, a **savanyú foszfatáz aktivitása csökkent szignifikánsan a nagy dózisoknál**. Minden dózisonál sérültek a

sejtmembránok (1, 2.5, 5µg/ml). Szignifikánsan csökkent az össz-glutation tartalom, továbbá a glutation peroxidáz és Cu,Zn-szuperoxid diszmutáz aktivitás mindkét sejtben. A TNF $\alpha$  koncentrációk az AM tenyészetekben emelkedtek, az MCP-1 expressziója mindkét sejt tenyészetében csökkent (12).

## **2. Kombinált – fizikai+kémiai – expozíciók hatása a tüdő alveoláris makrofágjainak és II.típusú pneumocytainak primer kultúrájára**

### **2.1. Azbesztpótló rostok+alfa sugárzás**

#### **2.1.1. Üvegyapot (salgótarjáni)+alfa sugárzás**

Az üvegrost (1, 5, 10 µg/ml koncentráció) nem okozott 10mGy alfa sugárzás hatására sem az alveoláris makrofágokban, sem a II.pneumocytaiban szignifikáns DNS károsodást míg a pozitív kontroll – kék azbeszt – és sugárzás kombinációjában megnőtt a DNS károsodás (13).

#### **2.1.2. Stone wool+ alfa sugárzás**

Az alfa sugárzás hatására az alveoláris makrofágokban és II. pneumocytaiban A comet teszt a DNS szálak fokozott törését mutatta a kontroll hoz képest (6).

#### **2.1.2. Kerámiarostok (RCF)+alfa sugárzás**

A kombinált kezelés hatására az emelkedő rost-dózisok alkalmazásával (1, 5, 10µg/ml) megnőtt ugyan a kombináltan kezelt sejtekben (10mGY) a DNS száltörések száma, de ez nem volt szignifikáns (13).

## **2.2. Alfa sugárzás és fémek hatása alveoláris makrofágok és II. pneumocyta primer kultúrájára (bystander hatás)**

#### **2.2.1. Alfa sugárzás és nikkeloxid**

Nem volt különbség a kombináltan kezelt és kizárólag nikkeloxiddal kezelt sejtek DNS töredezettsége között. Mindkét expozíció genotoxikus volt:a pneumocyta bizonyultak érzékenyebbnek, bennük szignifikánsak voltak a DNS sérülések ( 14,feltehetően a NiO rossz oldékonyságára vezethető vissza az azonos eredmény). Az apoptózis index 18%-ra emelkedett az első napra/metszet, majd a 6. hónap végére kontroll szintre csökkent.

#### **2.2.2. Alfa sugárzás+kadmiumklorid, bystander hatás tanulmányozása**

Azok a sejtek, amelyeket nem sugaroztunk be, (un. bystander sejtek) érzékenyen reagáltak az előzetesen besugarazott sejtekről eltávolított

tápfolyadék hatására, feltehetően a medium közvetítette a hatást. Hasonlóképpen az a sejtcsoport, amelyik nem volt besugarazva, a későbbi kadmiumklorid kezelésre érzékenyebben reagált, tehát a kombináció erősítette a citotoxikus hatást (MTT teszt). A kombinált kezelés hatására (kadmiumklorid+ 10 és 2 mGY) a besugarazott sejtekben szignifikánsan megnőtt a DNS száltörések száma és a mikronukleált sejtek száma (15).

**3.Kombinált kémiai+kémiai expozíciók hatása a tüdőszövetre: NiO+kerámiarostok, in vivo, in vitro toxicitás** (az ismertén karcinogén nikkeloxid és RCF párosítása azért történt, mert az utóbbit az IARC lehetséges (possible, 2B) karcinogénnek tartja, a kísérlettől a toxikus hatások fokozódását vártuk). Várakozásainkkal ellentétben az in vivo és in vitro kísérletekben egyaránt a nikkeloxid hatására jellemző morfológiai, biokémiai, immuntoxiciási és cytológiai eredményeket kaptuk (L. ott).

### **Összefoglalás és az eredmények értékelése**

**Egyszeri expozíció:** Az **azbesztpótló anyagok** - kőgyapot, kerámiarost - előnytelenül befolyásolják a tüdő redox kapacitását, immunszuppresszívek, amely alveoláris makrofágok és pneumocyták membránjainak sérülésére vezethetők vissza. A **nikkeloxid** döntően az alveoláris pneumocytákat károsítja, amely összefüggésben áll a tüdő immunrendszerének szuppressziójával, redox rendszerének károsításával, és a folyamatot károsan befolyásoló chemokinek termelődésével. A **Stachybotris chartarum** endo- és exotoxinjainak hatására a tüdő makrofágjaiban és alveoláris hámsejtjeiben csökkent a marker enzimek (sf, af) aktivitása, sérültek a sejtmembránok, amely miatt chemokinek szabadultak fel.

**Kombinált expozíciók: genotoxikus hatások:** az azbesztpótló rostok: a kőgyapot, kerámiarost és alfa sugárzás megnövelte a DNS száltörések számát a kontrollhoz képest. Az **NiO** és a **CdCl<sub>2</sub> + alfa sugárzás** hatására megnőtt a DNS lánc-töredezettség, különösen a II.pneumocytákban. Az apoptózis index az első napon 18%-ra emelkedett, majd a 6. hónap végére kontroll szintre csökkent. A CdCl<sub>2</sub> a fokozott DNS száltöredezettségen kívül, megnövelte a mikronukleált sejtek számát.

**Bystander hatást** csak a kadmium esetében vizsgáltunk, s ez pozitív eredménnyel zárult. **Biológiai hatások: NiO+kerámiarost:**a nikkloxid nem befolyásolta a kerámiarost hatásait. Nem alakultak ki malignus folyamatot megelőző hámelváltozások(metaplázia).

**Tervezett, de el nem végzett kísérletek:** 2007-re terveztük a sejtenyészetekben a redox rendszer egyes komponenseinek részletes vizsgálatát: cytoplasmátikus szuperoxid diszmutáz (Cu,Zn/SOD), iNOS, össz-glutation tartalom változásait mindenegyes kombinált expozícióban.

### Irodalom

1. Tátrai E, Brózik M, Drahos Á, Kováčiková Z, Six É, Csik M, Dám A. The effect of stone-wool on rat lungs and on the primary culture of rat alveolar macrophages and type II pneumocytes. J App Toxicol, 26, 16-24, 2006. IF: 1,850
2. Kováčiková Z, Petrovská H, Tátrai E, Dušinska M. The effect of fibrous dusts on lung cells. In vitro study. Centr Eur J Publ Health , S44-48, 2004.
3. Tátrai E, Brózik M, Kováčiková, Horváth M. The effect of asbestos and stone – wool fibres on some chemokines and redox system of pulmonary alveolar macrophages and pneumocytes type II. Biomed Papers 149, S1,36, 2005.
4. Kováčiková Z, Hurbánková M, Tátrai E, Černa S. Effect of intratracheal fibres exposure on the rat lung. Biomed Pap Med Unic Palacky Olomouc, 149, 363-365, 2005.
5. Tátrai E, Brózik M, Kováčiková Z. Redox status and expression of chemokines in the rat lungs on exposure to asbestos and asbestos substituents. Neuro Endocrinol Lett, 27 S2, 40-43, 2006. IF:1,005
6. Topinka J, Loli P, Dušinska, Hurbánková M, Kováčiková, Volková K, Kažimirová A, Barančoková M, Tátrai E, Wolff T, Oesterle D, Kyrtopoulos SA, Georgiadis P. Mutagenesis by man-made mineral fibres in the lung of rats. Mutat Res, 595, 174-183, 2006. IF: 5,016

7. Tulinska J, Kuricova, Liskova, Kovačikova Z, Tátrai E. The effect of ceramic fibres on the immune system. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 149(2),397-399, 2005.
8. Tátrai E, Kováčiková Z, Brózik M, Six É, Csík M, Tulinska J, Drahos Á, Dám A. The influence of refractory ceramic fibres on pulmonary morphology, redox and immune system in rats. J Appl Toxicol, 26, 500-508, 2006. IF:1,850
9. Tátrai E, Brózik M, Tulinska J, Kováčiková Z, Dám A. A nikkeloxid hatása a tüdő morfológiájára, redox rendszerére, a pulmonális és általános immunválaszra. Toxikológiai Konferencia Gallyatető, 2006.okt. Poszter
10. Tátrai E, Szalay Brigitta, Zuzana Kováčiková, Brózik Márta. How to influence ferric oxide nanoparticles the pulmonary morphology, redox system, production of immunoglobulines and chemokines? 2007. Cseh-Szlovák Toxikológiai Konferencia, Prága, poszter p.123.
11. Szalay B, Z. Kováčiková, M. Brózik, E. Tátrai. 2007. The effect of ferric oxide nanoparticles on the pulmonary morphology, redox system and immunoglobulins. Bírálatra elküldve az Exp Toxicol Pathol-ba
12. Kováčiková Z, E. Tátrai, E. Piecková, J. Tulinska, Z. Pivovarova, M. Matausic-Pisk, M. Kuricova, L. Wsolová. 2007. An in vitro study of the toxic effects of Stachybotrys chartarum metabolites on lung cells. ATLA 35, 47-52.
13. Bogdándi NE, AM Dám, M Sárdy. E. Tátrai. 2005. The effect of radon, asbestos and glass fiber on DNA damage. 35 Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Kos, Görögország, July, 3-4. előadás
14. Bogdándi NE, AM Dám, I Polony, M Sárdy, E Tátrai, T Kerényi, J Szabó, I Fehér. 2004. Combined effects of radon, asbestos, mineral dusts and heavy metals at cellular level. Proc. 33rd Annual meeting of the European Society for Radiation Biology. Budapest, Augusztus, 25-28. p. 69.
15. Drahos Á, Dám A, Bogdándi E, Tátrai E, Schoket B, Kerényi T, Fehér I. 2005. A környezeti légszennyező anyagok kombinált genotoxikus hatása: in vitro modell in „A környezeti ártalmak és a légzőrendszer „ XV.kötet. Szerk. Szabó T, Bártfai I, Somlai J; Zalaegerszeg, II. pp.81-90.

Budapest, 2007. június 28.

Dr Tátrai Erzsébet

az MT orvostudományok akadémiai doktora

